

## Short Report

## イネが形成するケイ酸ガラスの機能と構造に関する基礎研究

## 低環境負荷のものづくりに向けて

尾崎紀昭, 石田拓也, 大澤章良, 穴戸勇太, 佐藤裕弥, 岡野桂樹, 吉澤結子

秋田県立大学生物資源科学部応用生物科学科

生物が鉱物を形成するバイオミネラリゼーションは、原核生物から高等動物に至って広く見られる現象である。特にケイ酸を能動的に取り込み、重合してケイ酸ガラス（シリカ）を形成することを生体珪化作用（biosilicification）と呼ぶ。シリカを形成する代表的な生物として珪藻やガラス海綿などが良く研究されており、常温・常圧下におけるシリカ形成には特殊な有機物が関与していることが明らかになった。本研究では、秋田県の代表農産物であるイネを研究対象とし、未だ解明されていない高等植物のシリカ形成機構の解明をめざした。光学および電子顕微鏡、エネルギー分散型 X 線分析を用いてイネ葉身と籾殻に存在するシリカの形状、分布を明らかにした。葉身には多様な形状のシリカが存在していたが、葉身内部の機動細胞に形成されるシリカは時期特異的に形成され、出穂期に向けて増加することが分かった。高分解能走査型電子顕微鏡を用いてシリカの微細構造解析を行った結果、数十 nm の粒子から構成されていることが分かった。籾殻と稲わらに含まれるシリカの新規有効利用法についても考察した。

**キーワード：**バイオミネラリゼーション, イネ, ケイ酸, シリカ, 電子顕微鏡, 籾殻

生物が鉱物を形成するバイオミネラリゼーションは、常温・常圧下で行われる反応であるため、その分子機構の解明は、環境負荷の小さいものづくりのヒントとなりうる（尾崎 2013, Arakaki et al., 2015）。バイオミネラリゼーションにおける最大の特徴は、鉱物中に微量の有機物が含まれていることであり、有機物が鉱物形成を促進すると考えられている。バイオミネラリゼーションのうち、非結晶シリカを形成することを生体珪化作用という。バイオシリカの研究は珪藻と海綿動物において精力的に進められ、シリカに含まれる有機物の探索が行われた。その結果、両者に共通して存在する長鎖ポリアミンや高度に翻訳後修飾を受けたタンパク質などの有機物がその形成に重要であることが示された（Kröger et al., 2002, Matsunaga et al., 2007, Shimizu et al., 2015）。一方、ケイ酸輸送体の発見例（Ma et al., 2006）を除き、イネを含む高等植物のシリカ形成に関する研究例は少なく、シリカ形成機構の大部分は未解明のままで

ある。イネは秋田県を代表する農産物であるが、イネの生産にケイ素（およびケイ酸）が重要な関わりをもっていることが提唱されて以来、作物に対する有用元素としてケイ素が重要視されてきた。イネはケイ酸輸送体によって能動的にケイ酸を取り込み、最終的に葉や籾で非晶質シリカを形成する（図 1）。

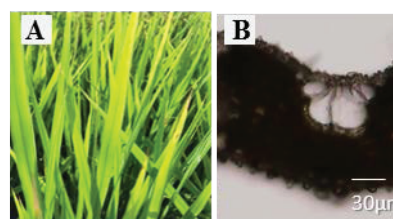


図 1 イネの葉身

A : 生育中のイネ, B : 葉身内のシリカ

細胞壁に沈着したシリカは容易には分解されないため、いもち病などの病原性菌や害虫による食害などの生物学的ストレス、乾燥や強風などの気象スト

レスなど多様な環境ストレスに対する抵抗性をイネに付与すると考えられている（高橋 2007）。

高等植物によって形成されるシリカは特に地質学・古生物学の分野ではプラントオパールと呼ばれ、植物体の枯死後も残存して土壌中に保存される。本研究はシリカの形成機構を解明するため、生育中のイネのシリカに焦点を当てた。まず、葉身を採取して表面に存在するシリカのモルフォロジーを分析した。次いで、シリカの形成時期の特定と形成途中のシリカを探索し、形成過程を推測した。イネの非食部（稲わら、籾殻）にはその乾燥重量の10%を超えるバイオシリカが沈着しているが、堆肥や畜舎敷料として利用される以外、用途が少なく、むしろ産業廃棄物として焼却処分されている現状がある。廃棄物系バイオマスの非晶質シリカの効率的な抽出方法の開発とその有効利用をめざした基礎的な検討を行った。

## 材料と方法

### 実験試料の採取

本研究に使用したイネ（あきたこまち、日本晴）の葉身は7月から10月にかけて秋田県立大学生物資源科学部附属フィールド教育研究センター圃場から採取した。採取したイネ葉身は流水で洗浄した後に水分を拭き取り、使用する直前まで $-30^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存した。

### 葉身の灰化とシリカの分離

イネ葉身を数 mm 大に切り分け、るつぼに入れて電気マッフル炉（TMF-2000, EYELA）で加熱することで灰化を行った。本研究においては、設定温度 $550^{\circ}\text{C}$ 、3時間の条件で加熱処理を行った。灰化後の試料を試験管に移し、蒸留水を加えて懸濁した。続いて卓上型超音波洗浄機（WT-100-M, Honda Electronics）を用いて破碎し、葉身から脱離したシリカを沈殿させた。また、灰化した葉身を光学顕微鏡で観察する際には、細断した葉身をスライドガラス上で銅線を巻きつけて固定し、上記と同様の条件で灰化を行った。

## 顕微鏡によるシリカの分析

イネ葉身、葉身から分離したシリカそれぞれの試料に対して、光学顕微鏡（BX-51, Olympus）、低真空走査型電子顕微鏡（JSM-5600LV, JEOL）、超高分解能走査型電子顕微鏡（SU8010, Hitachi）を用いて微細構造を分析した。セルロースの検出にはコンゴレッド染色を用いた。走査電子顕微鏡（以下 SEM と省略）で観察する際、試料のエタノールシリーズによる脱水操作、または凍結乾燥によって水分を蒸発させ、アルミニウム試料台上に貼付したカーボンテープに散布した。その後、金パラジウム蒸着を行い、加速電圧 $10\sim 20\text{ kV}$ で観察した。シリカの同定には SEM に付属のエネルギー分散型 X 線（EDX）分析装置（EMAXE Volution x-act, Horiba）を用いた。シリカの可溶化には $4\text{ M}$  フッ化水素酸溶液を用いた。

## 結果と考察

### イネ葉身に存在するシリカ

SEM と EDX による分析から、イネの葉身には少なくとも4種類以上の形態の異なるシリカが存在していた（図2）。先行研究（近藤と佐瀬, 1986）ではこれらのシリカは珪酸体と呼称され、形状ごとに名称がつけられているが、文献間に統一性がないことから、本稿では便宜上、プレート型シリカ（図2A）、プリックルヘア（図2B）、ダンベル型シリカ（図2C）、ファン型シリカ（図2D）と呼ぶことにする。ファン型を除くすべてのシリカは葉身表面に存在していた。一方、ファン型シリカは葉身内部の機動細胞（泡状細胞とも表記される）で形成されることが分かった。

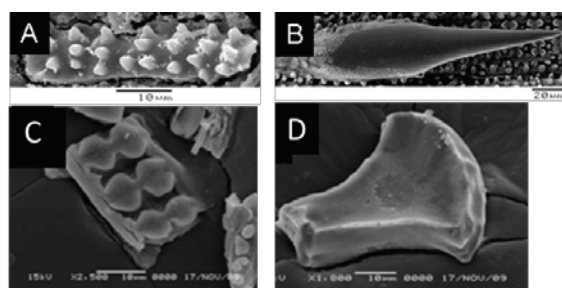


図2 葉身由来シリカの SEM 写真

A : プレート型, B : プリックルヘア  
C : ダンベル型, D : ファン型

灰化した葉身を光学顕微鏡で観察すると葉脈間の機動細胞列にシリカが連続して存在している様子が観察された (図3, 矢印)。

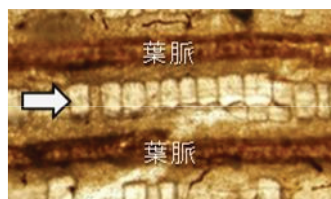


図3 灰化した葉身の光学顕微鏡写真

7月上旬に採集した葉身では図3に示すようなファン型シリカがほとんど観察されなかったことから、経時的に葉身をサンプリングし、灰化試料の単位面積 (1 mm<sup>2</sup>) あたりのファン型シリカを計数した。その結果、図4に示すように出穂期付近で大幅な増加が見られた。結果には示していないが幼穂および初めのケイ酸量を経時的に追跡した結果、葉身同様に出穂期にケイ酸量が増加していることが示唆された。以上の結果より、ケイ酸が稲穂の形成に向けて何らかの生理学的な役割を果たしている可能性が考えられた。

ファン型シリカの機能は未だ解明されていないが、シリカがレンズの役割をすることで光合成を高めるといった天窓仮説が提唱されていた (Kaufman et al., 1979) が、本仮説に対して否定的な研究結果も報告されており (Agarie et al., 1996), 今後はシリカの光学的特性、機械的特性などを詳細に調べる必要があると考えられる。

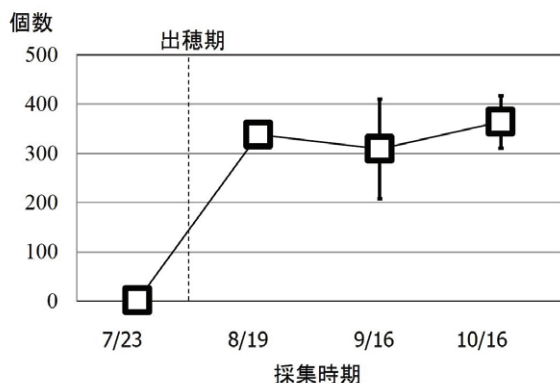


図4 止め葉におけるファン型シリカの個数

## シリカの微細構造

ファン型シリカの表面を高分解能 SEM で解析した結果、数十 nm のナノ粒子から構成されていることが分かった (図5)。結果には示していないが、ブリックルヘアやプレート型シリカも同様にナノ粒子から構成されていた。珪藻の被殻、海綿動物のシリカ骨格も同様に数十 nm のシリカナノ粒子から構成されており、バイオシリカに含まれる有機物によってシリカナノ粒子の形状とサイズが制御されていることから、イネにおいても類似の分子機構でシリカ粒子形成の制御が行われている可能性がある。著者らは分岐した構造をもつポリエチレンイミンを利用してイネのシリカに類似するナノ構造体ができることを確認している (Hoshino et al., 2016)。

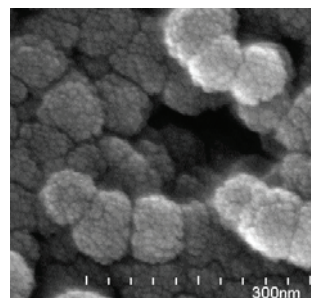


図5 ファン型シリカを構成するナノ粒子

## シリカと有機物

珪藻の被殻を構成するシリカにはシラフィン、シラシディン、シンギュリンと呼ばれる高度に翻訳後修飾されたタンパク質・ポリペプチドが含まれる (Kotzsch et al., 2016)。ガラス海綿のシリカ骨格にもシリカチン、グラシンと命名された特殊なタンパク質が含まれている (Shimizu et al., 2015)。単離したイネのファン型シリカをフッ化水素酸 (HF) 溶液で可溶化し、SDS-PAGE を行ったが、上記のタンパク質は含まれていなかった (データは示していない)。しかし、HF 溶液で処理後に残る不溶性の基質が確認された。ファン型シリカは機動細胞で形成されることから、不溶性基質は細胞壁由来と予想し、EDX 分析とコンゴレッド染色を行った (図6)。不溶性の構造体にはケイ素が検出されず、炭素と酸素のみが検出された。同構造体はコンゴレッドで赤色に染色されたことから、セルロース様の多糖類が含まれてい



ることが示唆された。イネの細胞壁におけるケイ酸の濃縮に $\beta$ -D-グルカンが関与していることを示している研究例もあるように (Kido et al., 2015), ファン型シリカは機動細胞の細胞壁を鋳型として形成されると考えられるが, ケイ酸が重合する際に促進剤として働くと予想される有機化合物の同定には至っていない。現在, ケイ酸重合活性の検定系を立ち上げ, 同活性を指標にシリカ内に含まれる有機化合物を探索中である。

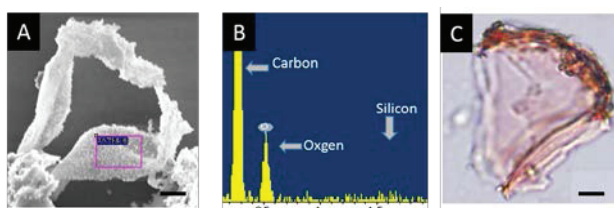


図6 HF不溶性構造体の化学分析

A : 構造体のSEM写真, B : EDXスペクトル

C : 構造体のコンゴレッド染色写真

### シリカの有効利用に向けて

稲わら, 籾殻には乾燥重量の10%を超えるシリカが沈着しているが, 両者は廃棄物系バイオマスとしてその大部分が焼却処分されているのが現状である。工業的に利用されている非晶質シリカは主に珪砂を高温に融解することで製造されている。自然界では珪藻土が存在するが, 珪藻や粘土由来の不純物が多く含まれている。したがって温和な条件で, 籾殻からシリカを高純度で抽出する手法が確立できれば, 籾殻はシリカ原料として有効活用できる付加価値の高いバイオマスへと変貌する。現在, 秋田県立大学システム科学技術学部の伊藤一志助教と共に常温で籾殻シリカを単離する技術の開発を行い, 籾殻由来のシリカの有効活用法として新素材(シリカ繊維強化ポリプロピレン)の創出を検討している。

### 謝辞

イネ葉身は秋田県立大学生物資源科学部生物生産科学科の藤田直子教授, 佐藤(永澤)奈美子准教授, 同学部アグリビジネス学科の永澤信洋准教授よりご提供頂いた。本研究の一部は, 平成27年度学長プロ

ジェクト「創造的研究」の支援を受けて行った。

### 文献

- Agarie, S., Agata, W., Uchida, H., Kubota, F., Kaufman PB. (1996). Function of silica bodies in the epidermal system of rice (*Oryza sativa* L.): testing the window hypothesis. *J. Exp. Bot.*, 47(298), 655-660.
- Arakaki, A., Shimizu, k., Oda, M., Sakamoto, T., Nishimura, T., Kato, T. (2015). Biomimetic synthesis of functional organic/inorganic hybrid materials: organic molecular control of self-organization of hybrids. *Org. Biomol. Chem.*, 13(4), 974-989.
- 尾崎紀昭 (2013). 「生物がつくる宝石 バイオミネラル化が未来を変える」。秋田県立大学(編)『ひとづくりとものづくり』(pp.106-107)。秋田魁新報社。
- Hoshino, T., Sato, K., Oaki, Y., Sugawara-Narutaki, A., Shimizu, K., Ozaki, N., Imai, H. (2016). Plant opal-mimetic bunching silica nanoparticles mediated by long-chain polyethyleneimine, *RCS Advances*, 6(2), 1301-1306.
- Kaufman, PB., Takeoka, Y., Carlson, TJ, Bigelow, WC., Jones, JD., Moore, PH., Ghosheh NS. (1979). Studies on silica deposition in sugarcane, using scanning electron microscopy, energy dispersive X-ray analysis, neutron activation analysis, and light microscopy. *Phytomorphology*, 29, 185-193.
- Kido, N., Yokoyama, R., Yamamoto, T., Furukawa, J., Iwai, H., Satoh, S., Nishitani, K. (2015). The matrix polysaccharide (1;3,1;4)- $\beta$ -D-glucan is involved in silicon-dependent strengthening of rice cell wall. *Plant Cell Physiol.*, 56(2), 268-276.
- 近藤鎌三, 佐瀬隆 (1986). 「植物珪酸体, その特性と応用」『第四紀研究』25, 31-63.
- Kotzsch, A., Pawolski, D., Milentyev, A., Shevchenko, A., Sheffel, A., Poulsen, N., Shevchenko, A, Kröger, N. (2016). Biochemical composition and assembly of biosilica-associated insoluble organic matrices

from the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *J. Biol. Chem.*, 291(10), 4982-4997.

Kröger, N., Lorenz, S., Brunner, E., Sumper, M. (2002). Self-assembly of highly phosphorylated silaffins and their function in biosilica morphogenesis. *Science*, 298(5583), 584-586.

Ma, JF., Tamai, K., Yamaji, N., Mitani, N., Konishi, S., Katsuhara, M., Ishiguro, M., Murata, Y., Yano, M. (2006). A silicon transporter in rice. *Nature*, 440(7084), 688-691.

Matsunaga, S., Sakai, R., Jimbo, M., Kamiya, H. (2007). Long chain polyamines (LCPAs) from the marine sponge: possible implication in spicule formation. *Chembiochem.*, 8(14), 1729-1735.

Shimizu, K., Amano, T., Bari, MR., Weaver, JC., Arima, J., Mori, N. (2015). Galassin, a histidine-rich protein from the siliceous skeletal system of the marine sponge *Euplectella*, directs silica polycondensation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 112(37), 11449-11454.

〔平成 28 年 7 月 20 日受付〕  
〔平成 28 年 7 月 31 日受理〕

## Studies on Biosilica Formation in the Leaves of Gramineous Plants Structure, Function, and Effective Utilization

Noriaki Ozaki, Takuya Ishida, Akiyoshi Osawa, Hayato ShiShido, Hiromi Sato, Keiju Okano,  
Yuko Yoshizawa

*Department of Biotechnology, Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University*

Biom mineralization is a widespread phenomenon by which living organisms produce minerals using organic materials under ambient temperature and normal pressure. A representative example of biologically formed silica has been well characterized in the cell wall of diatoms and spicules of glass sponges. Although gramineous plants produce large amounts of silica in their leaves and rice husks, the mechanism of biosilicification is not yet well understood. Here, we investigated the fundamental properties of silica bodies in rice leaves via optical microscopy, scanning electron microscopy (SEM), and energy-dispersive X-ray analysis. The number of fan-shaped silica bodies increases in the bulliform cells (bubble-shaped epidermal cells) during heading time. High-resolution SEM analysis revealed that the silica bodies are composed of nanoparticles dozens of nanometers in diameter, as is the case with diatom silica. Novel effective utilization of rice straw and rice husk is also discussed.

**Keywords:** Biom mineralization, Biosilicification, Rice, Rice husk, Silica, Scanning electron microscope